

Warszawa 02.08. 2022 r.

Prof. dr hab. Krzysztof Anusz

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego

Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie

Prof. dr hab. Marta Kankofer

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Przewodnicząca Rady Dyscypliny Weterynaria

Recenzja

pracy doktorskiej lek. wet. Łukasza Drozda

pt. "Ocena możliwości wykorzystania olejków eterycznych do redukcji mikrobioty w wybranych produktach wytworzonych z mięsa mielonego"

wykonanej w Katedrze Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Szkucika oraz promotora pomocniczego dr Moniki Ziomek.

Podstawę prawną wykonani recenzji rozprawy doktorskiej stanowi Uchwała Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 30 czerwca 2022 r.

Przede wszystkim, pragnę podkreślić aktualność tematyki przeprowadzonych przez Doktoranta badań. Zarówno wśród środowisk naukowych, czy też związanych z przemysłem spożywczym, jak i wśród konsumentów wzrasta zainteresowanie substancjami pochodzenia roślinnego, które mogłyby zastąpić konserwanty syntetyczne. Doktorant akcentuje również możliwość wytworzenie efektu synergii poprzez jednoczesne zastosowanie olejków

eterycznych oraz substancji, technologii konserwujących oraz nowoczesnych metod pakowania. Jednocześnie wykazano, że olejki eteryczne (aromatyczna mieszanina lotnych związków lipofilnych – związki fenolowe i terpenowe, alkohole alifatyczne, aldehydy, ketony, kwasy i izoflawonoidy) oddziałują przeciwwirusowo, przeciwbakteryjnie, przeciwgrzybiczo, przeciw pasożytniczo, a także mają właściwości przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, przeciwutleniające. Tym niemniej, efektywność ich działania zależy od wdrożenia odpowiednich procedur. W tym kontekście Doktorant zwrócił uwagę na kilka uwarunkowań, które mogą ograniczać oddziaływanie olejków eterycznych jako konserwantów w produktach mięsnych. Najważniejsze uwarunkowanie to wysoki poziom tłuszczu i białka powodujący, że olejki rozpuszczają się w fazie lipidowej i w konsekwencji mają mniejszy wpływ na bakterie obecne w fazie wodnej produktu. Zmniejszenie się właściwości przeciwdrobnoustrojowych jest również następstwem wiązania przez tłuszcz i białka lotnych składników olejków eterycznych. Pomimo powyższych uwarunkowań, wielu autorów wykazało działanie przeciwdrobnoustrojowe olejków eterycznych w mięsie i produktach mięsnych, a także w odniesieniu do mleka i ryb. Tytuł pracy doktorskiej został sformułowany prawidłowo, tak jak będący jego odzwierciedleniem główny cel – ocena możliwości wykorzystania olejków eterycznych do redukcji mikrobioty w produktach wytworzonych z mięsa mielonego i poddanych obróbce termicznej. Cel główny był możliwy do osiągnięcia dzięki realizacji celów szczegółowych – określenie wartości minimalnych stężeń hamujących MIC (Minimal Inhibitory Concentration) olejków eterycznych w stosunku do wybranych bakterii oraz ocena wpływu dodatku wybranych olejków eterycznych na cechy sensoryczne oraz poziom zanieczyszczenia mikrobiologicznego gotowanych kul mięsnych. W obszernym wstępie i omówieniu wyników badań znajdujemy odpowiednie odniesienia do literatury światowej i polskiej, obejmującej powyższą tematykę. Struktura pracy jest uporządkowana i przejrzysta. Należy zwrócić uwagę na bardzo staranne opracowanie tekstu.

Doktorant przyjął prawidłową koncepcję schematu i metodyki badań. Schemat badań obejmował dwie fazy.

W pierwszej fazie badań określono minimalne stężenia hamujące dla dziesięciu olejków eterycznych z bazylii, czarnuszki, cząbrzu, goździka, majeranku, mięty kędzierzawej, mięty pieprzowej, rozmarynu, szaławii oraz tymianku. Do oznaczenia minimalnych stężeń hamujących (MIC) Doktorant zastosował metodę seryjnych dwukrotnych rozcieńczeń w bulionie Mueller Hinton II Broth, w której jako indykatora wzrostu bakterii Gram + (*Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 33591, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228) i Gram – (*Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 13311, *Yersinia enterocolitica*) wykorzystano 0,01% roztwór resazuryny - zredukowanej w obecności żywych bakterii, czego wskaźnikiem jest zmiana barwy z niebieskiej na różową. Jako wartość MIC przyjęto najniższe stężenie olejku eterycznego, zapobiegające zmianie barwy.

W drugiej fazie badań użyto 5 olejków eterycznych, które w pierwszej fazie badań wykazały wysoką skuteczność w hamowaniu wzrostu bakterii. Były to olejki eteryczne z bazylii, czarnuszki, cząbrzu, majeranku oraz tymianku, które dodawano do mielonej szynki wieprzowej oraz mielonego fileta z kurczaka. Następnie przygotowano 3 rodzaje kul mięsnych, w których koncentracja olejków eterycznych wynosiła 0,01mg/g, 0,5mg/g i 1 mg/g. Próbkę kontrolną stanowiły kule mięsne bez dodatku olejków. Materiał ten służył do przeprowadzenia badań organoleptycznych (badanie cech sensorycznych przez 6-osobowy zespół, zgodnie z Polskimi Normami – określono intensywność i pożądalność wrażeń zapachowych oraz smakowych) i mikrobiologicznych (określenie wpływu olejków

eterycznych na wzrost mikrobioty poprzez oznaczenie ogólnej liczby drobnoustrojów oraz liczby drobnoustrojów psychotrofowych) .

Wiarygodność uzyskanych wyników wzmacnia bardzo dokładna analiza statystyczna przy użyciu programu Statistica 13.1 (StatSoft, Inc) oraz arkusza kalkulacyjnego Excel (MS Office, Microsoft USA). Wpływ czynników zmienności na oznaczone parametry określono w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji na poziomie istotności 5%. Ustalając statystycznie istotne różnice pomiędzy porównywanymi grupami zastosowano test post-hoc wielokrotnych podziałów ufności T Tukeya dla $p \leq 0,05$. Do obliczeń wykorzystano pakiet Statistica 10 firmy StatSoft.

Doktorant wykazał, że olejki eteryczne hamują wzrost drobnoustrojów, w stopniu uzależnionym od rodzaju i koncentracji określonego olejku oraz wrażliwości poszczególnych bakterii. Najmniej wrażliwa bakteria na działanie hamujące to *Enterococcus faecalis*, a najbardziej wrażliwa to *Klebsiella pneumoniae*. Wyniki badań organoleptycznych (zapach i smak kul mięsnych) wskazują na istotne ograniczenia w stosowaniu olejków eterycznych, związane z niekorzystnym wpływem na cechy sensoryczne produktów mięsnych. Najbardziej pożądanym zapachem i smakiem stwierdzono zarówno w kulach wieprzowych, jak i drobiowych z dodatkiem olejku eterycznego z czarnuszki. Najmniej pożądanym smakiem i zapachem w obu rodzajach kul mięsnych stwierdzono po dodaniu olejku eterycznego z cząbrzu. Smak i zapach mięsa wieprzowego z dodatkiem olejków eterycznych były bardziej pożądanymi w porównaniu do mięsa drobiowego.

Dokonując oceny wpływu koncentracji olejków eterycznych na liczbę drobnoustrojów w badanych kulach mięsnych nie stwierdzono istotnych różnic w ogólnej liczbie drobnoustrojów oraz liczbie drobnoustrojów psychotrofowych w dniu ich wytworzenia oraz po 3 dniach chłodniczego przechowywania. Dopiero po 6 dniach chłodniczego przechowywania w kulach

z mięsa drobiowego wykazano istotny wpływ stężenia olejków eterycznych, ale tylko na poziom ogólnego bakteryjnego zanieczyszczenia - wykazano istotny wpływ olejku z bazylii, cząbrku, majeranku i tymianku. Natomiast oceniając wpływ koncentracji olejków na ogólną liczbę drobnoustrojów w kulach z mięsa wieprzowego w 6 dniu ich chłodniczego przechowywania, istotne różnice stwierdzono tylko w kulach z dodatkiem olejku z cząbrku (1 mg/g). Nie stwierdzono istotnego wpływu stężenia badanych olejków eterycznych na liczbę drobnoustrojów psychrotrofowych w wieprzowych kulach mięsnych, a w przypadku produktów wytworzonych z mięsa drobiowego tylko stężenie olejku eterycznego z cząbrku miało znaczący wpływ na liczbę bakterii psychrotrofowych w 6. dniu chłodniczego przechowywania.

Doktorant po przeprowadzeniu analizy wyników badań wyciągnął 5 wniosków. Wszystkie są w pełni uzasadnione, mogłyby jednak być przedstawione w sposób mniej rozdrobniony. Proponuję ograniczenie do 3 wniosków zawierających w sobie treść dotychczasowych 5 wniosków. Jest to więc jedynie propozycja redakcyjna. Proponuję:

1. Olejki eteryczne hamują wzrost drobnoustrojów obecnych w mięsie drobiowym i wieprzowym, jednakże ich oddziaływanie uzależnione jest od rodzaju olejku i zastosowanego stężenia. Najbardziej skuteczny w hamowaniu jest olejek eteryczny z cząbrku.
2. Możliwość zastosowania olejków eterycznych w żywności pochodzenia zwierzęcego wymaga odpowiedniego stężenia, które zapewnia działanie hamujące wzrost drobnoustrojów, a jednocześnie jest akceptowane sensorycznie. Najkorzystniejsze cechy sensoryczne wykazywały wyroby mięsne z dodatkiem czarnuszki.
3. Rodzaj mięsa i związane z nim cechy sensoryczne wpływają na poziom akceptacji dodatku olejku eterycznego.

Omawiają wyniki badań, Doktorant słusznie podkreśla, że skuteczne hamowanie wzrostu drobnoustrojów w żywności jest możliwe przy stosowaniu wysokich stężeń olejków eterycznych, będących przyczyną niepożądanych cech organoleptycznych. Potencjalnie olejki eteryczne mogłyby być wykorzystane w formie nanokapsulek lub jako składnik opakowań bezpośrednich żywności. Uważam, że dalsze badania tak właśnie powinny być ukierunkowane.

Uzyskane przez doktoranta wyniki stanowią oryginalny i istotny wkład do krajowego i międzynarodowego piśmiennictwa w zakresie możliwości wykorzystania olejków eterycznych do redukcji mikrobioty w produktach z mięsa mielonego.

Podsumowując recenzję stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta, a także Jego umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy badawczej. Praca ma charakter innowacyjny. Tym samym praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim – Ustawa z dnia 14.03. 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65 poz. 595 z późn. Zm.) w zw. Z art. 179 ust. 3 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669).

Z uwagi na innowacyjność przeprowadzonych badań oraz ich wysoką wartość merytoryczną rekomenduję wyróżnienie ocenianej pracy doktorskiej.

Prof. dr hab. Krzysztof Anusz

